

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001591

拘束应激对特应性皮炎样小鼠模型皮肤炎症影响的实验研究

谭 琦,任发亮,杨 欢,王 华

(重庆医科大学附属儿童医院皮肤科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、
儿童发育重大疾病国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘要】目的:观察拘束应激对特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)样小鼠皮肤炎症的影响。**方法:**将 28 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠分为 4 组:2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene,DNCB)诱导-拘束应激组、DNCB 诱导-对照组、丙酮诱导-拘束应激组和丙酮诱导-对照组,每组 7 只。第 14 天评估小鼠皮肤中炎症细胞浸润程度,Q-PCR 方法检测皮损组织中干扰素- γ (interferon- γ ,IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)和白细胞介素-13(interleukin-13,IL-13)等细胞因子的 mRNA 表达变化。**结果:**DNCB 诱导-拘束应激组的真皮炎症细胞浸润数为 42.710 ± 3.944 个,DNCB 诱导-对照组的真皮炎症细胞浸润数为 26.000 ± 2.410 个,有统计学差异($P < 0.01$);相对于 DNCB 诱导-对照组,DNCB 诱导-拘束应激组皮损组织中 IL-4、IL-13 等细胞因子的 mRNA 表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**拘束应激加剧 AD 的炎症反应。

【关键词】应激;特应性皮炎;疾病模型**【中图分类号】**R758.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-03-22

Effect of restraint stress on the inflammation of atopic dermatitis-like animal model

Tan Qi, Ren Faliang, Yang Huan, Wang Hua

(Department of Dermatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorder; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders)

【Abstract】Objective: To study the effect of restraint stress on the inflammation changes of atopic dermatitis animal model. **Methods:** Twenty eight 6 to 8 weeks' female BALB/c mice were divided into 4 groups: DNCB-induced model restraint stress group, DNCB-induced model restraint stress control group, acetone-induced model restraint stress group and acetone-induced model restraint stress control group. At the 14th day, mice were sacrificed and dermal infiltrated inflammatory cells and mRNA levels of inflammatory cytokines of skin lesions were analyzed by microscope histopathology and Q-PCR respectively. **Results:** In DNCB-induced model restraint stress control group, the numbers of infiltrated inflammatory cells in dermal were significantly lower than DNCB-induced model restraint stress group (42.710 ± 3.944) vs. (26.000 ± 2.410) ($P < 0.01$). The mRNA levels of IL-4 and IL-13 were significantly elevated in DNCB-induced model restraint stress group. **Conclusion:** Restraint stress might accelerate the inflammatory response of atopic dermatitis.

【Key words】stress; atopic dermatitis; disease models

国外研究发现,应激刺激是诱发或加重特应性皮炎(atopic dermatitis,AD)病情的病因之一,其参与的具体发病机制目前仍不明确^[1],可能是通过复杂的神经内分泌免疫网络参与其中。本研究拟采用

拘束应激的刺激方法,观察应激对 AD 样小鼠模型临床皮肤病理以及局部免疫产生的影响,为进一步了解应激在 AD 发病机制中的作用提供一定的理论基础。

作者介绍:谭 琦,Email:Qitan_dermatol@aliyun.com,

研究方向:特应性皮炎的发病机制。

基金项目:重庆市卫生局医学科研发助项目(2011-2-23)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1431.024.html>
(2018-04-08)

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠购自重庆医科大学动物实验中心,并在该

中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级别饲养。恒定室温,过滤空气,空气湿度 55%~60%,光照 10~12 h/d。饲料、饮用水均经过消毒处理。6~8 周成年鼠雌雄配对,生新生小鼠备用。所有操作均在超净工作台上进行。所用的主要试剂:引物来自美国 Invitrogen 公司,焦碳酸二乙酯产自美国 Sigma 公司,Trizol RNA 抽提试剂产自美国 Promega 公司,2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)产自杭州常青化工有限公司,氯仿、异丙醇、无水乙醇产自上海化学试剂研究所有限公司。

1.2 方法

1.2.1 特异性皮炎样动物拘束应激模型构建 参照文献^[2],选取 28 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,实验动物使用许可证[SYXK(渝)2012-0001],实验动物质量合格证[SCXK(渝)2012-0001]。AD 样模型构建:小鼠麻醉后,后背下半部分剃毛,面积约 1 cm × 1 cm,第 1 周,14 只小鼠外擦溶解于丙酮的 1% DNCB 100 μL,每 3 天 1 次,连续 2 次,余下 14 只小鼠仅外擦丙酮作为对照组。第 2 周,同一部位外擦 0.2% DNCB 或丙酮,每 3 d 1 次,连续 2 次。在 AD 样模型构建过程中,上述 2 组小鼠随机分配 7 只用胶带将前爪、躯干上部缠绕,每天固定 2 h,形成部分拘束应激^[3],余下 7 只未予应激刺激。整个实验小鼠分为 DNCB 诱导-拘束应激组、DNCB 诱导-对照组、丙酮诱导-拘束应激组和丙酮诱导-对照组,每组 7 只。

1.2.2 皮肤组织病理学和皮肤炎症细胞浸润观察 炎症细胞浸润度:400 倍显微镜下,每个标本随机选取 10 个视野计数。

1.2.3 皮损组织中 IFN-γ、IL-4 和 IL-13 的 mRNA 表达 Trizol 法提取皮损组织 RNA,将 RNA 沉淀溶解于适量(20~50 μl)无核糖核酸酶的水中。Q-PCR 检测 IL-4、IFN-γ 和 IL-13 的 mRNA 表达。逆转录反应体系的配制:总体积 20 μl,2×逆转录缓冲液 10 μl,随机引物(100 μmol/L)1 μl,混合物 1 μl,模板(RNA)3 μl,DEPC 水 5 μl。逆转录反应条件的设置:25 ℃ 10 min,42 ℃ 50 min,85 ℃ 5 min。荧光定量 PCR 反应体系的配制:总体积 50 μl,2×PCR 缓冲液 25 μl,Primers(25 μmol/L)2 μl,SYBR green I 0.5 μl,cDNA 0.5 μl,DEPC 水 20.5 μl。扩增条件的设置:94 ℃ 4 min;94 ℃ 20 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 循环 35 次,72 ℃ 检测信号。IL-4、IL-13、IFN-γ 及 β-肌动蛋白的引物序列分别如下。IL-4:正向 5'-GTCATCCTGCTCTT-CTTTCTCG-3',反向 5'-GTGTTCTTCGTTGCTGTGAGG-3',

扩增长度 161 bp;IL-13:正向 5'-CTTGCTTGCCTTGGTGGTC-3',反向 5'-TGCACAGGGGAGTCTGGTC-3',扩增长度 124 bp;IFN-γ:正向 5'-TCAACAACCCACAGGTCCAG-3',反向 5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCC-3',扩增长度 100 bp;β-肌动蛋白:正向 5'-GAGACCTTCAACACCCAGC-3',反向 5'-ATGTCA-CGCACGATTTCCC-3',扩增长度 263 bp。结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 进行统计分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两组样本之间比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HE 染色下皮肤病理改变和炎症细胞浸润观察

如图 1 所示,DNCB 诱导-拘束应激组、DNCB 诱导-对照组小鼠的皮肤病理改变符合 AD 特点,表现为表皮增厚、棘细胞水肿、真皮中有淋巴细胞浸润等。但 DNCB 诱导-拘束应激组小鼠的真皮炎症细胞浸润数(42.710 ± 3.944)均高于 DNCB 诱导-对照组(26.000 ± 2.410),差异具有统计学意义($P<0.01$),见表 1。

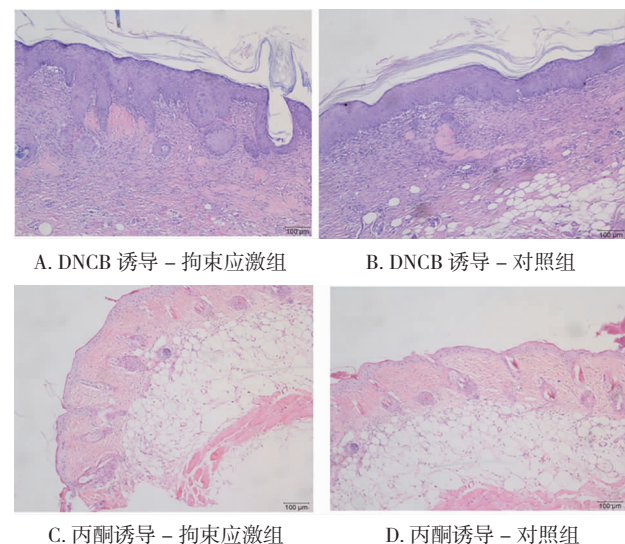


图 1 特异性皮炎样小鼠皮肤病理变化(100×)

Fig.1 Pathology of AD-like mice(100×)

表 1 小鼠皮肤炎症细胞浸润和 Th1/Th2 细胞因子 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=7$)

Tab.1 Infiltrated inflammatory cells in dermal and mRNA levels of Th1/Th2 cytokines($\bar{x} \pm s, n=7$)

检测项目	DNCB诱导 - 拘束应激组	DNCB诱导 - 对照组	丙酮诱导 - 拘束应激组	丙酮诱导 - 对照组	F 值	P 值
炎症细胞浸润	42.710 ± 3.944	26.000 ± 2.410	22.140 ± 3.143	12.57 ± 1.478	18.926	0.000
IFN-γ mRNA	0.066 ± 0.009	0.045 ± 0.007	0.023 ± 0.003	0.015 ± 0.003	15.416	0.020
IL-4 mRNA	0.121 ± 0.020^a	0.070 ± 0.004	0.027 ± 0.003	0.025 ± 0.004	18.866	0.002
IL-13 mRNA	0.317 ± 0.370^a	0.147 ± 0.025	0.058 ± 0.005	0.040 ± 0.004	31.047	0.000

注:a 与 DNCB 诱导 - 对照组相比

2.2 小鼠皮损组织中 IFN- γ 、IL-4 和 IL-13 的 mRNA 表达

予以拘束应激后,小鼠皮炎皮损组织中 IFN- γ 、IL-4、IL-13 等细胞因子的 mRNA 表达上升,分别为 0.066 ± 0.009 、 0.121 ± 0.020 、 0.317 ± 0.37 ,与 DNCB 诱导-对照组相比,IL-4、IL-13 的表达增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

3 讨 论

AD 是一种常见的慢性复发性炎症性皮肤病,发病机制复杂,涉及遗传背景、免疫学异常、皮肤屏障功能、应激等多个方面^[4]。AD 不仅引起机体瘙痒不适,还影响个体与家庭的生活质量,造成较重的个人经济与社会负担。随着医学模式的转变,社会心理因素在疾病中的作用越来越受到人们的重视。Kwon 等^[5]研究发现,青少年 AD 患者发生的应激事件与疾病的严重度呈正相关,也是疾病发生的危险因素。因此,探讨精神应激事件在 AD 发病机制中的作用逐渐受到人们的关注。

精神应激在 AD 中的作用机制涉及多个方面。精神压力可以通过激活下丘脑-垂体-肾上腺轴促使肾上腺皮质激素释放素分泌增多,刺激血管再生和调节免疫细胞活性^[6]。机体对应激的反应之一就是交感-肾上腺髓质系统活化,释放儿茶酚胺,调控 T 淋巴细胞分化^[7]。研究发现,精神应激事件加重破坏皮肤屏障功能,延缓皮肤修护,使多种抗原或半抗原更容易侵入机体,诱发或加剧免疫反应^[8]。同时,精神应激事件还造成机体免疫功能紊乱,表现为焦虑引起机体血清 IgE 升高^[9]。

Amano 等^[10]报道了 Nc/Nga 小鼠在 SPF 环境下不会自发形成 AD 样皮损,但在相同环境中予以避水心理应激 5 min 后,小鼠开始搔抓,皮肤表现为红斑、糜烂,皮肤病理显示表皮增厚、海绵水肿,提示应激在 AD 的发生中发挥促进作用。本实验利用 DNCB 诱导的 AD 样动物模型中,实验组采用拘束应激后,组织病理方面,表皮与真皮厚度增加的程度均高于对照组,证实应激可以加剧炎症反应,加重病情。与此同时,精神应激还可对机体的免疫功能产生影响,长期的精神压力造成 Th1/Th2 细胞功能失衡^[11]。

本研究中采用的拘束应激被认为是研究应激对机体免疫应答影响的经典模式^[12]。应激对免疫功能的影响程度取决于应激时间的长短:急性应激可加重炎症,而慢性反复的应激则产生免疫抑制^[13]。本研究在 DNCB 诱导的急性期皮炎基础上予以拘束应激后,IFN- γ 、IL-4、IL-13 等细胞因子的 mRNA

表达明显高于对照组,提示短时间的拘束应激可促进炎症反应,其作用机制可能与影响 T 淋巴细胞的分化有关,这与国外的研究结果一致^[11]。精神应激并不是单一作用于某一系统,而是通过复杂的神经内分泌免疫系统相互作用参与炎症,但具体的作用环节仍有待进一步研究。充分认识精神应激在 AD 中的作用,尽早疏导应激造成的紧张焦虑,将有助于疾病的治疗。

参 考 文 献

- [1] Noh S, Kim M, Park CO, et al. Comparison of the psychological impacts of asymptomatic and symptomatic cutaneous diseases: vitiligo and atopic dermatitis[J]. *Ann Dermatol*, 2013, 25(4): 454-461.
- [2] Lee SH, Heo Y, Kim YC. Effect of German chamomile oil application on alleviating atopic dermatitis-like immune alterations in mice[J]. *J Vet Sci*, 2010, 11(1): 35-41.
- [3] Gue M, Del Rio-lacheze C, Eutamene H, et al. Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 1997, 9(4): 271-279.
- [4] Kim BE, Leung DY. Epidermal barrier in atopic dermatitis[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2012, 4(1): 12-16.
- [5] Kwon JA, Park EC, Lee M, et al. Does stress increase the risk of atopic dermatitis in adolescents? results of the Korea Youth Risk Behavior Web-Based Survey (KYRBWS-VI)[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e67890.
- [6] Senra MS, Wollenberg A. Psychodermatological aspects of atopic dermatitis[J]. *Br J Dermatol*, 2014, 170(S1): 38-43.
- [7] Hall JM, Cruser D, Podawiltz A, et al. Psychological stress and the cutaneous immune response: roles of the HPA axis and the sympathetic nervous system in atopic dermatitis and psoriasis[J]. *Dermatol Res Pract*, 2012, 2012: 403908.
- [8] Orion E, Wolf R. Psychological stress and epidermal barrier function[J]. *Clin Dermatol*, 2012, 30(3): 280-285.
- [9] Hashizume H, Horibe T, Ohshima T, et al. Anxiety accelerates T-helper 2-tilted immune response in patients with atopic dermatitis[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 152(6): 1161-1164.
- [10] Amano H, Negishi I, Akiyama H, et al. Psychological stress can trigger atopic dermatitis in Nc/Nga mice: an inhibitory effect of corticotropin-releasing factor[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(3): 566-573.
- [11] Dhabhar FS. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin[J]. *Clin Dermatol*, 2013, 31(1): 18-30.
- [12] Mi W, Belyavsky M, Johnson RR, et al. Alterations in chemokine expression following Theiler's virus infection and restraint stress[J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 151(1-2): 103-115.
- [13] Oliver SJ, Mathew S, Wilder TF, et al. Restraint stress fails to modulate cutaneous hypersensitivity responses in mice lacking the adenosine A1 receptor[J]. *Purinergic Signal*, 2011, 7(1): 47-56.

(责任编辑:冉明会)